



Préparation d'échantillons FFPE

Objectif :

Ce mode opératoire technique a pour but de décrire la préparation de *tissus tumoraux fixés au formaldéhyde inclus en paraffine (FFPE)* :

- 1- pour la qualification : confirmation de la nature du prélèvement, du type histologique et évaluation du pourcentage de cellules tumorales
- 2- pour la préparation de matériel en vue de la réalisation d'une extraction d'ADN et/ou d'ARN.

Domaine d'application :

Ce mode opératoire technique s'applique à tous types de fragments de tumeurs : microbiopsies, biopsies ou pièces opératoires.

Responsable :

Ce mode opératoire technique est mis en œuvre par le Responsable opérationnel pré-analytique amené à gérer les modes opératoires pré-analytiques de la plateforme.

Diffusion pour application :

Ce mode opératoire technique est diffusé par l'ingénieur responsable assurance qualité au Responsable opérationnel pré-analytique pour diffusion et application par l'ensemble du personnel concerné des services d'anatomopathologies.

Éléments documentaires nécessaires :

PRO-Doc-014-Documentation

ENR-Pré-062-Consigne envoi FFPE

Matériels utilisés :

- *Microtome*
- Gants
- Blouse
- Un flacon d'éthanol 70 stérile (qualité biologie moléculaire)
- Un flacon de solution de décontamination permettant de supprimer la présence de RNase dans le cryostat (Exemple RNase Away, RNAZap)
- Lames de verre 76x26 avec plage dépolie
- Lames de rasoir en fonction du modèle du microtome
- Pince à épiler
- Lames de scalpel stériles type B22
- Un crayon à papier taillé
- Un rouleau de papier essuie-tout
- **Microtube à fermeture sécurisée type tube Eppendorf 1,5 mL safe lock**

Définition :

FFPE : Formalin Fixed Paraffin Embedded = Tissu fixé au formaldéhyde inclus en paraffine



Archivage :

Les documents qui se rattachent à ce mode opératoire technique sont archivés suivant **PRO-Doc-014-Documentation**.

Table des matières :

I – Préparation des échantillons inclus en paraffine	2
I – 1 - Sélection de la zone tumorale d'intérêt.....	2
I – 2 - Préparation du matériel pour la collecte de matériel	2
I – 3 - Préparation de lame HPS	2
II - Réalisation de la collecte du matériel inclus en paraffine	3
II – 1 - Collecte du matériel sur coupes.....	3
II – 2 - Collecte du matériel par grattage.....	3
III- Enregistrement des informations de pré-qualification.....	4
ANNEXE	6

I – Préparation des échantillons inclus en paraffine

I – 1 - Sélection de la zone tumorale d'intérêt

Le but est d'enrichir le matériel en cellules tumorales, le pathologiste entoure au feutre sur la lame HES la ou les zones d'intérêt.

- Sortir le bloc de paraffine ainsi que la lame HPS correspondant. **Si aucune lame HPS n'est disponible pour la sélection** réaliser une coupe HPS (voir paragraphe I - 3)
- Faire sélectionner une zone *tumorale* d'intérêt et estimer le pourcentage de cellules tumorales, par le médecin anatomopathologiste.

I – 2 - Préparation du matériel pour la collecte de matériel *tissulaire*

- Annoter deux microtubes (type Eppendorf) de **1,5 mL** avec le numéro d'échantillon AURAGEN et/ou le numéro d'identification de l'échantillon pour chacun des échantillons à *préparer* ainsi qu'un suffixe _ADN ou _ARN.



En cas d'impossibilité de préparer 2 tubes, préparer un seul tube pour lequel seul le séquençage génome complet (WGS) sera réalisé.

I – 3 - Préparation de la lame HPS

- Nettoyer à l'alcool 70° le microtome, le porte-lame, les instruments (pinces, pinceaux) puis **nettoyer avec la solution d'inhibiteurs enzymatiques (RNase Away, RNAZap...)**.
- Placer une lame de rasoir neuve et la changer pour chaque patient, à défaut, la nettoyer à l'alcool 70° puis à la solution d'inhibiteurs enzymatiques.
- Préparer une lame porte objet identifiée au crayon de papier sur la plage dépolie avec le numéro d'échantillon AURAGEN et/ou le numéro d'identification de l'échantillon à couper.



En cas de préparation de plusieurs échantillons pour AURAGEN : veuillez noter l'heure de coupe afin de tracer l'ordre de coupe des échantillons.

II - Réalisation de la collecte du matériel inclus en paraffine

Le port de la blouse et de gants sont obligatoires tout au long de la manipulation.

La collecte du matériel est réalisée :

- Soit par coupes (maximum 5 coupes de 5µm pour ADN et 5 coupes pour ARN),
- Soit par grattage sur bloc de paraffine (2 mm³ maximum par tube),
- Soit par grattage sur lame blanche (en fonction de la surface du prélèvement, prévoir à minima 5 lames de 5µm pour ADN et 5 lames pour ARN et au maximum 10 lames dans chacun des tubes).



Concernant la quantité de matériel, les recommandations du kit d'extraction utilisé sont de 2mm³ maximum de matériel. Une trop grande quantité de matériel entraîne une diminution de rendement d'extraction.

II – 1 - Collecte du matériel sur coupes

- Nettoyer à l'alcool 70° le microtome, le porte-lame, les instruments (pinces, pinceaux) puis **nettoyer avec la solution d'inhibiteurs enzymatiques (RNase Away, RNAZap...).**
- Placer une lame de rasoir neuve et la changer pour chaque patient, si possible ou à défaut la nettoyer à l'alcool 70° puis à la solution d'inhibiteurs enzymatiques
- Faire à la main et à l'aide d'un scalpel propre à usage unique un trait de coupe dans le bloc de manière à délimiter la zone sélectionnée par le médecin anatomopathologiste
- Réaliser les copeaux en ne conservant que la zone d'intérêt qui se détache au niveau du trait de coupe et la placer dans un microtube **1,5 mL** annoté. Eliminer l'autre partie.
- Répéter ainsi les étapes précédentes pour obtenir *environ* 5 coupes de 5µm pour ADN et 5 coupes pour ARN en fonction de la taille du prélèvement.

Si d'autres tubes doivent être réalisés pour d'autres patients, reprendre la procédure, après avoir parfaitement nettoyé le plan de travail, le microtome et jeté tout le matériel à usage unique utilisé pour le premier cas.

Les tubes sont ensuite expédiés au LBMMS AURAGEN suivant l'enregistrement **ENR-Pré-062-Consigne envoi FFPE**. Ils doivent être stockés à température régulée (+15-25°C) avant envoi.

II – 2 - Collecte du matériel par grattage

- Nettoyer soigneusement la paillasse à l'alcool 70°.
- Prendre les microtubes préparés précédemment
- Installer le bloc ou les lames blanches à gratter sur un champ propre.
- Prendre une lame de scalpel neuve.
- Gratter la zone d'intérêt avec la lame de scalpel en se guidant avec la lame HPS repérée par le médecin anatomopathologiste.
- Placer les copeaux issus du grattage dans les **microtubes 1,5 mL** préparés au préalable.
- Fermer le tube.



Exemple de grattage sur bloc :



a) Prélèvement volumineux

b) Petit prélèvement/ biopsie

Si d'autres microtubes doivent être réalisés pour d'autres patients, reprendre la procédure, après avoir parfaitement nettoyé le plan de travail et jeté tout le matériel à usage unique utilisé pour le premier cas.

Les tubes sont ensuite expédiés au LBMMS AURAGEN suivant l'enregistrement **ENR-Pré-062-Consigne envoi FFPE**. Ils doivent être stockés à température régulée (+15-25°C) avant envoi.

III– Enregistrement des informations de pré-qualification

Une fois la pré-qualification terminée, saisir les données de celle-ci dans l'outil de prescription HYGEN pour chacun des prélèvements analysés en vous connectant sur votre compte (<https://hygen.auragen.fr/>).

Vous trouverez ci-dessous les informations à saisir (* saisie obligatoire) ainsi qu'un document en annexe qui peut être utilisé comme fiche de lecture avant remplissage de HYGEN.



GCS AURAGEN
5 place d'Arsonval
Bâtiment B7
69003 LYON

Préparation des échantillons FFPE

MOT-Pré-004-02

Version : 2

Applicable le : 23-02-2024



Numéro de demande HYGEN KC-2000101
Date de demande HYGEN 16/04/2020

Qualification des échantillons somatiques

Id. prélèvement (ou n° examen anapath)*



Autres identifiants



Autres infos



Cliquer ici pour saisir un texte

Quantité de matériel*

mm³

Nombre de tubes préparés par la plateforme INCa*

☐

1

☒

2

Nb. de copeaux de 10 µm par tube*

Qualification*

☐

oui

☐

non

Conservation*

% de cellule tumorale*

Valider



GCS AURAGEN
5 place d'Arsonval
Bâtiment B7
69003 LYON

Préparation des échantillons FFPE

MOT-Pré-004-02

Version : 2

Applicable le : 23-02-2024



ANNEXE

AURAGEN_ Lecture Coupe HPS

Date de coupe / Heure :	
Technicien(ne)	
Id. prélèvement	Numéro demande : Identifiant du bloc : Identifiant du tube de collecte :
Autres infos – Commentaires	
Quantité de matériel mm ³	
Nombre de microtubes : minimum 2 microtubes* (1 pour extraction d'ARN, 1 pour extraction d'ADN)	tube ADN = tube ARN = tube supplémentaire =
Nombre de copeaux/coupes par tube (si applicable, pour les grattages sur bloc mettre 0)	

Organe	
Type histologique	
Conservation	FFPE
Mode de prélèvement	☐ biopsie ☐ pièce opératoire
Qualification	☐ oui ☐ non si non pourquoi : ☐ erreur de prélèvement ☐ tissu normal ☐ prélèvement épuisé ☐ cellules tumorales = 0
Commentaires	
% cellules tumorales	HPS ☐ 0 ☐ 30 ☐ 1 à 9 ☐ 50 ☐ 10 à 19 ☐ 80 ☐ 20 à 29 ☐ 100
Pathologiste	Nom : Dr Signature :

*Attention : si envoi d'1 seul tube, l'examen WGS à partir d'une extraction d'ADN sera priorisé.